

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005446

International filing date: 17 March 2005 (17.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2004-076804  
Filing date: 17 March 2004 (17.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 May 2005 (12.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

17. 3. 2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2004年 3月17日

出願番号  
Application Number: 特願2004-076804

パリ条約による外国への出願  
に用いる優先権の主張の基礎  
となる出願の国コードと出願  
番号

The country code and number  
of your priority application,  
to be used for filing abroad  
under the Paris Convention, is

JP2004-076804

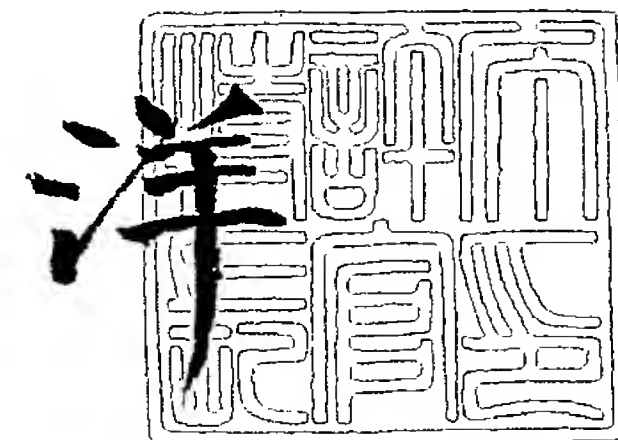
出願人  
Applicant(s):

学校法人東海大学  
愛知県

2005年 4月20日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



出証番号 出証特2005-3036156

【書類名】 特許願  
【整理番号】 A41234A  
【提出日】 平成16年 3月17日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県平塚市袖ヶ浜 1 8 - 4 1 - 4 1 1  
    【氏名】 小島 直也  
【発明者】  
    【住所又は居所】 神奈川県川崎市多摩区登戸 4 9 5 - 3  
    【氏名】 清水 佳隆  
【発明者】  
    【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区鹿子殿 1 番 1 号 愛知県がんセンター研究  
    所内  
    【氏名】 池原 譲  
【発明者】  
    【住所又は居所】 愛知県名古屋市千種区鹿子殿 1 番 1 号 愛知県がんセンター研究  
    所内  
    【氏名】 中西 速夫  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000125369  
    【氏名又は名称】 学校法人東海大学  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000116622  
    【氏名又は名称】 愛知県  
【指定代理人】  
    【識別番号】 504010040  
    【氏名又は名称】 大野 龍三  
    【代理関係の特記事項】 特許出願人愛知県の指定代理人  
【代理人】  
    【識別番号】 110000109  
    【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス  
    【代表者】 今村 正純  
    【代理関係の特記事項】 特許出願人学校法人東海大学の代理人  
【復代理人】  
    【識別番号】 110000109  
    【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス  
    【代表者】 今村 正純  
    【代理関係の特記事項】 指定代理人大野龍三の復代理人  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 170347  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含む、投与物質を標的部位に送達するためのドラッグデリバリーリポソーム組成物。

**【請求項 2】**

オリゴ糖がオリゴマンノースである、請求項 1 に記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。

**【請求項 3】**

オリゴ糖がマンノペンタオース又はマンノトリオースである、請求項 1 又は 2 に記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。

**【請求項 4】**

投与物質が、薬物、マーカ―または造影剤である、請求項 1 から 3 の何れかに記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。

**【請求項 5】**

腹腔内に投与され、腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達される、請求項 1 から 4 の何れかに記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。

**【請求項 6】**

標的部位が、腹腔内の癌の初期腹腔内転移病巣である大網や腸管膜の節外性小リンパ節である、請求項 1 から 5 の何れかに記載のドラッグデリバリーリポソーム組成物。

【書類名】 明細書

【発明の名称】 免疫応答システムを利用したドラッグデリバリーシステム

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、オリゴ糖被覆リポソームを用いたドラッグデリバリーリポソーム組成物に関する。より詳細には、本発明は、腹腔内に投与した際に腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達されることを特徴とする、オリゴ糖被覆リポソームを用いたドラッグデリバリーリポソーム組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

癌の術後の再発は癌患者の生存率の向上を阻む最大の障壁となっており、この再発を抑制することは癌の臨床上最も重要な課題の一つである。根治手術後の再発の主たる原因は手術時に既に撒布されている遊離癌細胞あるいは目に見えない微小転移によると考えられており、この微小転移を検出して治療することは、癌患者の予後に直結する重要な課題である。胃癌では、根治手術後の再発形式として腹膜再発が50%以上を占め、患者の予後を決める最も重要な因子である。現在のGoldstandard、腹腔洗浄細胞診による細胞診陽性の診断は予後不良を意味する。

【0 0 0 3】

しかしながら、細胞診陰性の症例からの腹腔再発が少なからず見られるなど、上記の方法は検出感度が低く、腹膜微小転移の検出は事実上不可能である。これまでの所、癌胎児抗原（CEA）を指標とするRT-PCR法を用いた腹腔内遊離癌細胞の高感度の検出法が確立されている。また、1995年から臨床検体を用いた解析を8年に渡って行った結果、腹膜再発のリスクの高さが生命予後に直結していることが明らかになっている。現在、高度先進医療として、腹腔内再発のリスク評価を行うとともに、胃癌患者の予後改善のための治療法の開発が検討されている。

【0 0 0 4】

一方、抗癌剤の投与に際して、リポソームは、より選択的に癌局所へ抗癌剤を到達させ、治療効果を高めると同時に正常組織への集積を抑えることで副作用の軽減を図る目的で用いられている。血管内に投与されたリポソームは、血管透過性の亢進した腫瘍血管では癌組織中に漏れ出し、局所に滞留する性格を有している。従って、薬剤送達システムとしては、passive targetingと呼ばれるものである。一方、抗体などの特異的結合能を利用した薬剤送達システムはactive targetingと呼ばれている。従来の方法はリポソームを直接、癌細胞へ到達させることを目的としている。この場合、リポソームは、血中のマクロファージには取り込まれないようにしつつ血行性に癌部に送達することを目的として、開発されてきた。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 5】

上記の通り、腹膜微小転移の有無の検出は可能になりつつあるが、腹膜微小転移の局所を特定する方法は存在しない。胃癌の腹膜内転移は、乳斑と呼ばれる大網や散在する腸間膜の節外性小リンパ節を足がかりとして生じることが臨床的に知られている。本発明者らはこれまでに、GFP遺伝子を導入した転移性細胞と、簡便なGFP検出システムを組み合わせることで、乳斑に生じてくる微小転移を非侵襲的に可視化できる微小転移マウスモデルを確立し、微小転移が大網や腸管膜リンパ節に生じてくることを見出し、さらにマウスを用いた実験で初期腹腔内転移の早期に抗癌剤を投与すると有効であることを見出している。しかし、腹腔という広い空間に薬剤を投与すると薬剤の有効濃度に至らない、あるいは有効濃度に維持しようとすれば非常に高濃度の薬剤を投与することとなり、薬剤の血中移行など副次的な問題が生じるため、現時的ではなく、有効な投与方法がないのが現状である。従って、腹膜微小転移相という局所にドラッグデリバリーシステムで薬剤を集中させることができれば、有効な投与方法となりうる。即ち、本発明は、抗癌剤など



の投与物質を標的部位に効率良く集積させることができるドラッグデリバリー組成物を提供することを解決すべき課題とした。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、オリゴマンノースで被覆したリポソームを腹腔内に投与すると、非常に特異的かつ迅速に腹腔内常在性マクロファージによって取り込まれることを見出した(図1)。また、このオリゴマンノース被覆リポソームを特異的に取り込んだマクロファージが12時間から24時間という短時間で初期腹腔内転移の生じる局所である乳斑と呼ばれる大網や腸管膜リンパ節に散在する節外性リンパ節に集積することを見出した(図2)。また、実際に腹腔内におけるオリゴマンノース被覆リポソームを取り込んだマクロファージの集積場所と癌細胞の微小転移の生じる場所が同じであることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【0007】

即ち、本発明によれば、オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含む、投与物質を標的部位に送達するためのドラッグデリバリーリポソーム組成物が提供される。

【0008】

好ましくは、オリゴ糖はオリゴマンノースであり、さらに好ましくは、オリゴ糖はマンノペンタオース又はマンノトリオースである。

好ましくは、投与物質は、薬物、マーカーまたは造影剤である。

【0009】

好ましくは、本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、腹腔内に投与され、腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達される。

好ましくは、標的部位は、腹腔内の節外性小リンパ節又は腸管膜リンパ節である。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、抗癌剤などの投与物質を標的部位に効率良く集積させることができるドラッグデリバリーリポソーム組成物を提供することが可能になった。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下、本発明の実施の形態について具体的に説明する。

本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含むことを特徴とするものであり、投与物質を標的部位に送達するために使用される。さらに具体的には、本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物は、腹腔内に投与された場合に、腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達される。本発明における標的部位は、好ましくは、癌の初期腹腔内転移病巣である大網や腸管膜の節外性小リンパ節である。

【0012】

本発明で用いるオリゴ糖被覆リポソームとしては、例えば、特許第2828391号公報に記載のリポソームを用いることができる。オリゴ糖を構成する糖成分の種類は特に限定されないが、例えば、D-マンノース(D-Man)、L-フコース(L-Fuc)、D-アセチルグルコサミン(D-GlcNAc)、D-グルコース(D-Glc)、D-ガラクトース(D-Gal)、D-アセチルガラクトサミン(D-GalNAc)、D-ラムノース(D-Rha)などが挙げられる。

【0013】

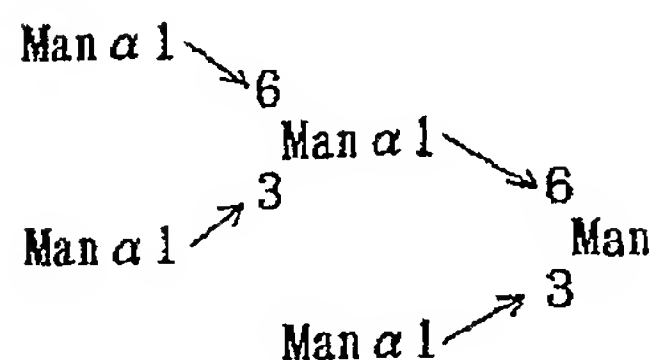
オリゴ糖中で、各構成糖は、 $\alpha 1 \rightarrow 2$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 3$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 4$ 結合、 $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合又は $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合等あるいはこれらの組合せにより結合している。例えば、マンノースは上記の結合により単鎖を構成してもよく、又は $\alpha 1 \rightarrow 3$ 結合と $\alpha 1 \rightarrow 6$ 結合との組合せにより分枝構造をとってもよい。オリゴ糖中の単糖の数は、好ましくは2~11個である。具体的なオリゴ糖として、例えばマンノビオース(Man<sub>2</sub>)、マンノトリオース(Man<sub>3</sub>)、マンノテトラオース(Man<sub>4</sub>)、マンノペンタオース(Man<sub>5</sub>)、マンノ

ヘキサオース (Man 6)、マンノヘプタオース (Man 7)、種々の混合オリゴ糖、例えば下記に示す M5 (化1) 及び RN (化2) 等を挙げることができる。

【0014】

【化1】

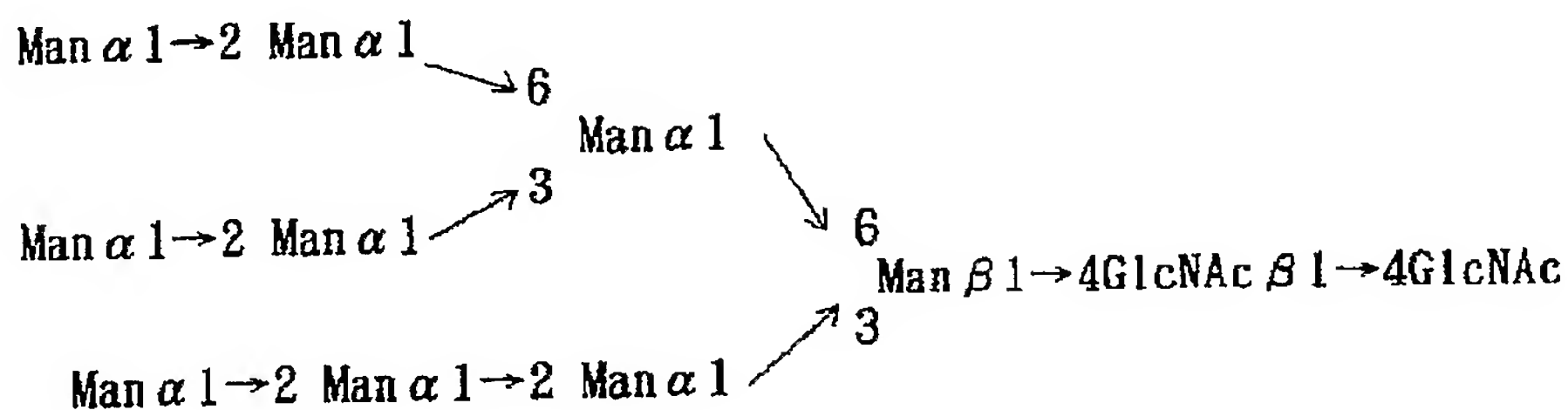
M5



【0015】

【化2】

RN



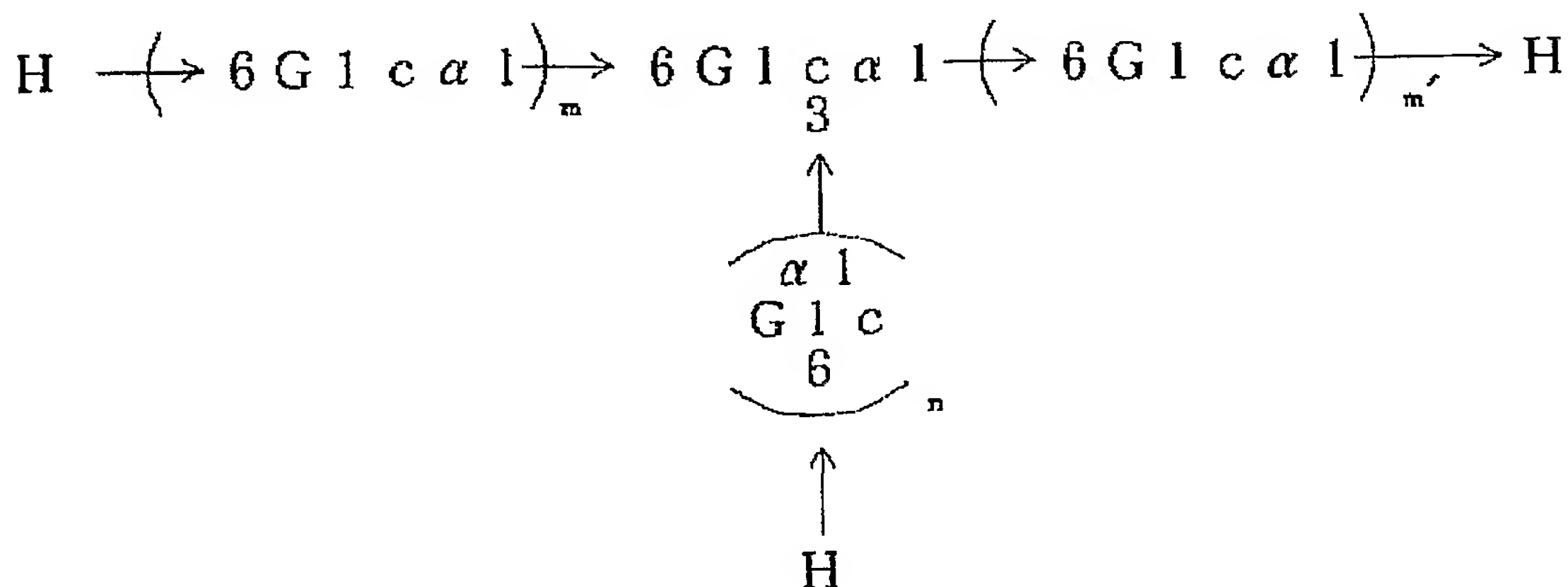
(式中、 $\alpha 1 \rightarrow 2$  結合している Man は、それぞれ独立に、存在してもよく存在しなくてもよい。)

【0016】

らに、グルコースを含有するオリゴ糖として化3に示す構造を有するものを挙げることができ、N-アセチルグルコサミンを含むオリゴ糖として化4に示すものを挙げることができ、そしてフコースを含むオリゴ糖として化5に示すものを挙げることができる。

【0017】

【化3】



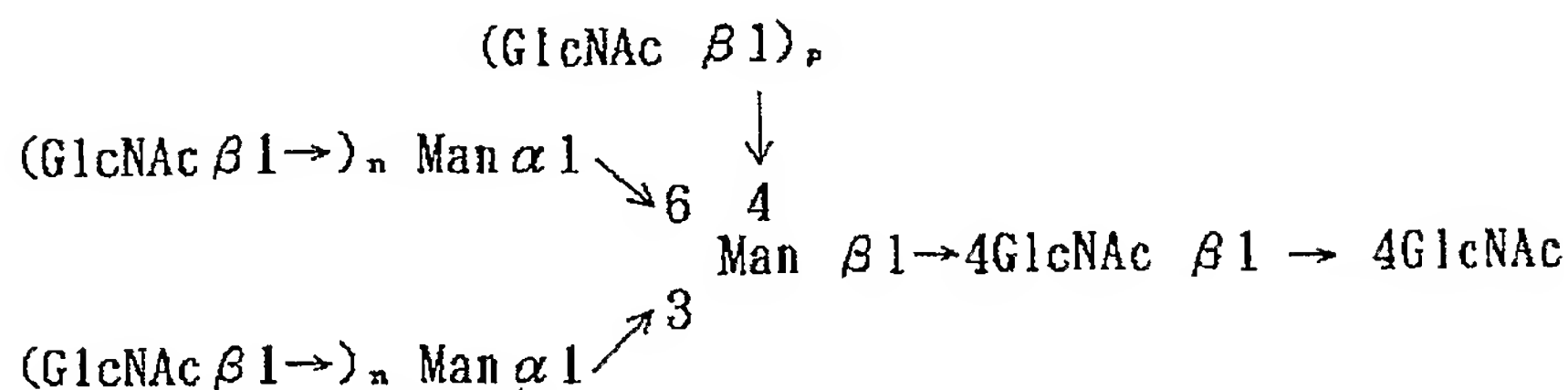
( $m + m' + n$  は 1 ~ 10)

【0018】

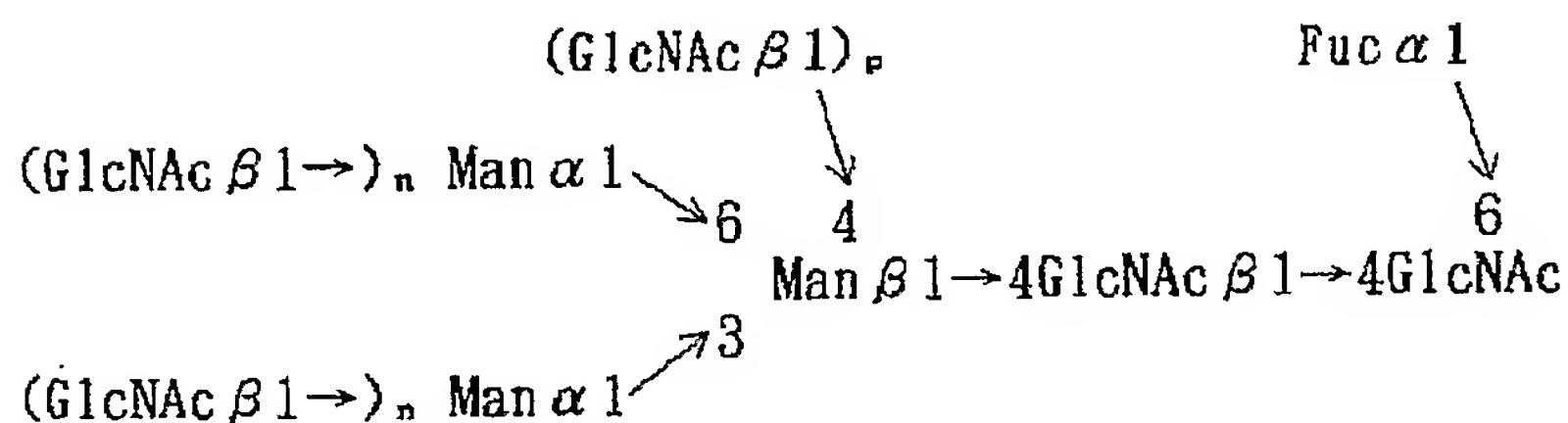
## 【化 4】



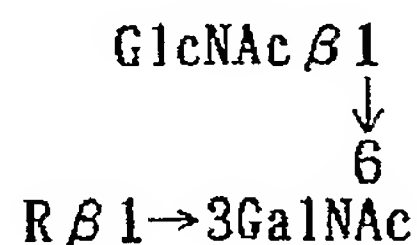
(n は 0 ~ 4)



(p は 0 又は 1 であり、n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。式中右側の 4GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  4GlcNAc で示した 2 つの GlcNAc 残基は、それぞれ独立にあってもなくてもよい。また、(GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$ )<sub>n</sub> で示した GlcNAc はどれも右隣の Man の空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)



(p は 0 又は 1 であり、n はそれぞれ独立に 0 ~ 3 である。また、(GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$ )<sub>n</sub> で示した GlcNAc はどれも右隣の Man の空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)



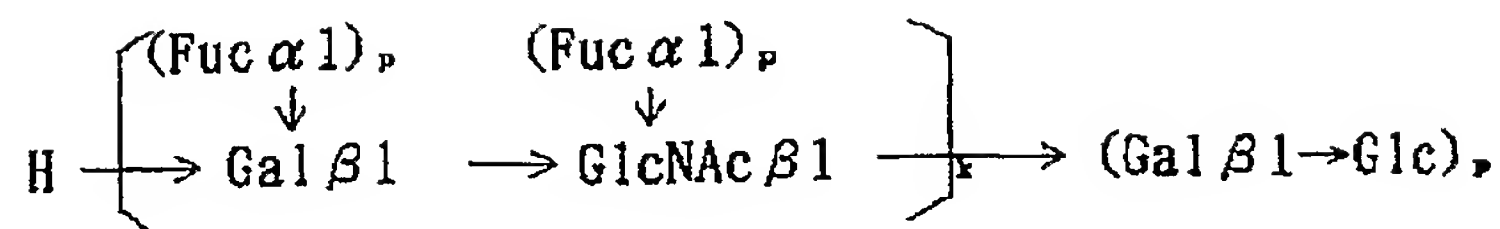
R は H, GlcNAc、又は (GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  6)<sub>p</sub> (GlcNAc  $\beta$  1  $\rightarrow$  3)<sub>p</sub> Gal

(p は 0 又は 1 である。)

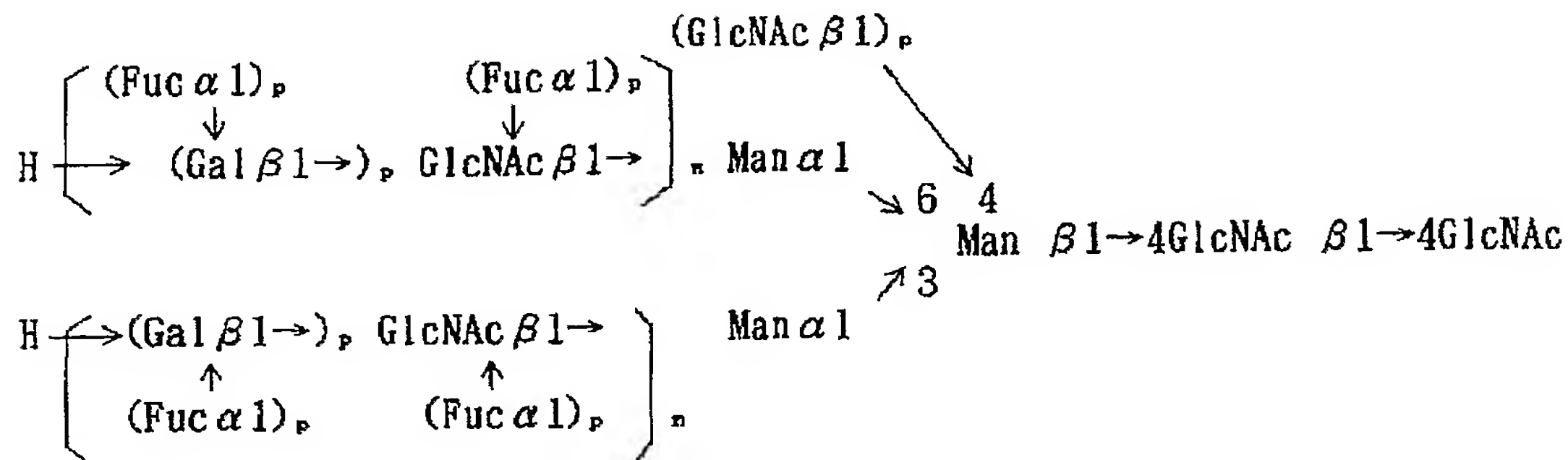
## 【0 0 1 9】



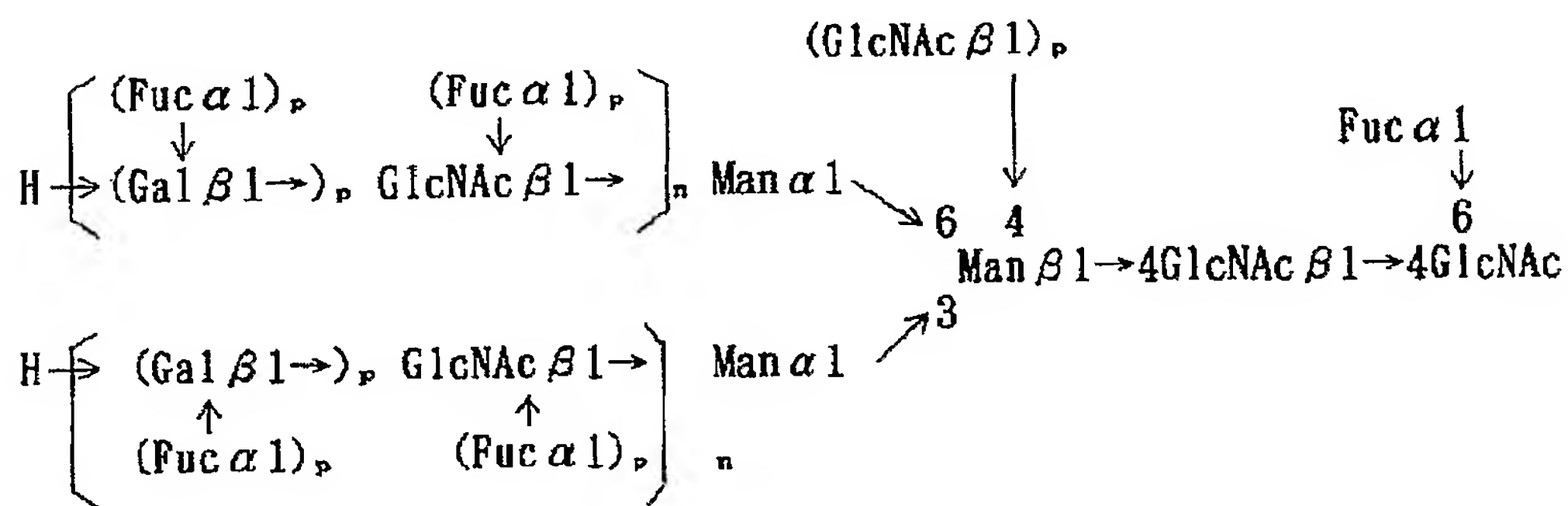
## 【化5】



(kは1～5であり、pはそれぞれ独立に0又は1である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。)



(pはそれぞれ独立に0又は1であり、nはそれぞれ独立に0～3である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の  $4GlcNAc \beta 1 \rightarrow 4GlcNAc$  で示した2つのGlcNAc残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)



(pはそれぞれ独立に0又は1であり、nはそれぞれ独立に0～3である。矢印の先に行先の番号のないものは、空いている水酸基のどこにグリコシド結合してもよい。また、式中右側の  $4GlcNAc \beta 1 \rightarrow 4GlcNAc$  で示した2つのGlcNAc残基はそれぞれ独立にあってもなくてもよい。)

## 【0020】

本発明で用いるオリゴ糖は好ましくは、オリゴマンノースであり、特に好ましくはマンノペンタオース又はマンノトリオースである。

## 【0021】

上記のオリゴ糖は、いずれも1個の還元末端アルデヒド基を有する。そこで、このアルデヒド基を、オリゴ糖をリポソーム表面に導入するための手段として使用することができる。すなわち、このアルデヒドと、アミノ基を有する脂質との間に反応によりシッフ塩基

を形成し、次にこのシッフ塩基を、常法に従って、還元、好ましくは化学還元、例えば  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  により還元することにより、オリゴ糖と、脂質とを結合することができる（水落次男、糖質工学、224-232頁、産業調査会バイオテクノロジー情報センター、1992）。

#### 【0022】

上記のアミノ基を有する脂質は、好ましくはアミノ基を有するリン脂質であり、例えばホスファチジルアミン、例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）等を使用することができる。上記のようにして得られた、オリゴ糖と脂質との結合物を、本発明においては人工糖脂質と称する場合がある。

#### 【0023】

リポソームを構成する脂質としては、リポソームを構成するために知られている任意の常用の脂質を単独で又は複数組み合わせ使用することができる。例えば、天然物、例えば卵黄、大豆、又はその他の動植物から得られる脂質、これらの脂質を修飾したもの、例えば水素添加によって不飽和度を低下したもの、あるいは化学合成したものを使用することができる。具体的には、例えば、ステロール類、例えばコレステロール（Chol）；ホスファチジルエタノールアミン類、例えばジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE）；ホスファチジルコリン類、例えばジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）；ホスファチジルセリン類、例えばジパルミトイルホスファチジルセリン（DPPS）、ジステアロイルホスファチジルセリン（DSPS）；ホスファチジン酸類、例えばジパルミトイルホスファチジン酸（DPPA）、ジステアロイルホスファチジン酸（DSPA）、等が挙げられる。

#### 【0024】

リポソームの作製は公知の方法 [D.W. Deamer, P.S. Uster, "Liposome" ed. by M.J. Ostro, Marcel Dekker Inc., N.Y. Basel, 1983, p27] を用いて行うことができる。ボルテックス法および超音波法が一般的であるが、そのほかにエタノール注入法、エーテル法および逆相蒸発法などが適用でき、これらを組合せて使用することもできる。

#### 【0025】

例えば、ボルテックス法および超音波法においては、所定の脂質を有機溶剤、例えばメタノール、エタノール、クロロホルム又はこれらの混合物、例えばメタノールとクロロホルムとの混合物に溶解した後、該有機溶剤を蒸発除去することにより脂質の薄層を得る。次に、この脂質の薄層に水性媒体を加えてボルテックス処理又は超音波処理することによりリポソームが形成される。この際に、上記水性媒体に、薬物、マーカまたは造影剤などの投与物質を混入、例えば溶解又は懸濁させておくことにより、該投与物質をリポソームに封入することができる。

#### 【0026】

オリゴ糖をリポソームの表面に導入するためには、例えば、次の2つの方法のいずれかを用いればよい。前記の人工糖脂質が水溶性で有機溶剤に十分溶解しない場合、例えば、前記のM5とDPPEとの結合物（M5-DPPE）、RNとDPPEとの結合物（RN-DPPE）を用いる場合には、これらの水性溶液を調製し、これを形成されたりポソームと混合して、例えば4℃ないし室温において24～120時間、例えば約72時間インキュベーションすればよい。

#### 【0027】

他方、人工糖脂質が有機溶剤に溶解する場合には、該人工糖脂質を、リポソーム構成用脂質と共に、リポソーム製造過程において前記のごとき有機溶剤に溶解し、以後、常法に従ってリポソームを形成すればよい。リポソームの量に対するオリゴ糖の量はオリゴ糖の種類、封入しようとする抗原の種類、リポソームの組合せ構造等により異なるが、一般に、リポソームを構成する脂質1mgに対して5μg～500μgである。

#### 【0028】

本発明で用いるリポソームは、多重層タイプ (multilamella vesicle) であってもよく、また単層タイプ (unilamella vesicle) であってもよい。これらは既知の常法に従って調製することができ、また常法に従って一方のタイプを他方のタイプに、例えば多重層タイプのリポソームを単層タイプのリポソームに転換することもできる。本発明で用いるリポソームの粒径は特に限定されないが、必要により常法に従って、例えば所望の孔サイズのフィルターにより濾過することにより、粒径を整えることができる。

#### 【0029】

本発明で用いる投与物質は、好ましくは、薬物、マーカー、または造影剤である。薬物としては、抗癌剤、癌ワクチン、抗原ペプチド、免疫活性化剤 (ピシバニールなど)、サイトカイン、血管新生阻害剤などが挙げられる。

#### 【0030】

本発明で用いることができる抗癌剤の種類は特に限定されず、アルキル化薬 (例えば、シクロホスファミド、塩酸ニムスチン、イホスファミド、ラニムスチン、チオテパ、メルファラン、ブスルフェン、ダカルバジン、カルボコン、塩酸プロカルバジンなど)、代謝拮抗薬 (例えば、シタラビン、テガフル、シタラビンオクホスファート、エノシタビン、リン酸フルダラビン、レボホリナートカルシウム、塩酸ゲムシタビン、メトトレキサート、メルカプトプリン、カルモフル、6-メルカプトプリンリボシド、ヒドロキシカルバミド、フルオロウラシル、ホリナートカルシウム、ドキシフルリジンなど)、分子標的治療薬 (チロシンキナーゼ阻害薬) 又はアルカロイド (硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンデシン、硫酸ビンブラスチンなど) が挙げられる。

#### 【0031】

マーカーとしては、GFPなどの蛍光タンパク質、フルオロ・デオキシ・グルコースなどが挙げられる。また、造影剤としては、非イオン性水溶性ヨード造影剤、水溶性ヨード造影剤、低浸透圧水溶性ヨード造影剤などが挙げられる。

#### 【0032】

リポソームの量に対する投与物質の量は、投与したリポソーム組成物が腹腔内のマクロファージによって取り込まれて標的部位に送達されるという本発明の効果が得られる限り特に限定されず、投与物質の種類やリポソームの組成や構造等により適宜設定することができる。一般的には、投与物質の量は、リポソームを構成する脂質1mg当たり1 $\mu$ g~100 $\mu$ gである。

#### 【0033】

本発明のリポソーム組成物は、所望により薬学的に許容される担体を含んでいてもよい。担体としては、滅菌水、緩衝液又は食塩水を用いることができる。また、本発明のリポソーム組成物は、所望により塩類、糖類、蛋白質、澱粉、ゼラチン、植物油およびポリエチレングリコール等を含んでいてもよい。

#### 【0034】

本発明のリポソーム組成物の投与経路は特に限定されないが、好ましくは腹腔内に投与することができる。本発明のリポソーム組成物の投与量は、投与物質の種類、投与経路、症状の重篤度、患者の年齢および状態、副作用の程度等により変動するが、一般に、0.1~100mg/kg/日の範囲である。

#### 【0035】

次に本発明のドラッグデリバリーリポソーム組成物の利用方法について説明する。

(1) 腹腔内マクロファージを運び屋とした、腹腔内節外性リンパ節への抗癌剤のドラッグデリバリーシステム

M3リポソーム (FITC-BSAを封入) を腹腔内に投与すると、時間経過にともない大網乳斑及び腸管膜リンパ節へ集積してくる。腹腔内の免疫系を破綻させたマウスでは、リポソームが脾臓へ一部漏れるが、そうでない場合には、脾臓に存在するマクロファージへの取り込みはほとんど見られない。ゆえに、このリポソームに抗癌剤を封入すると、腹腔内リンパ節に生じた転移初期病変に抗癌剤を集積して働かせることが可能となる。有効な抗癌剤は、強い副作用を持つことが多く、この点を改善するために種々のドラッグデ



リバリーシステムが考案されている。抗腫瘍効果は一般に腫瘍内の薬剤濃度に依存しているので、M3リポソームを用いることで腫瘍局所に集積できる技術は、抗癌剤デリバリーシステムとして広く利用できる。本発明のシステムは、以下の3つの免疫学的機序に基づくステップに基づいている。

#### 【0036】

(i) 表面にマンノースを抱合したM3リポソームは、会合したマクロファージによって特異的、迅速に貪食されリソソームへ蓄積される。

(i i) マンノース受容体を介した細胞内取り込みは、マクロファージを活性化する。この活性化によって、マクロファージは抗原提示するために領域リンパ節辺縁洞に集積する。

(i i i) リンパ節に到達したマクロファージは、リソソームで消化しきれないものを接着面細胞外へ排出する。

#### 【0037】

この方法を用いることで、効率よく高濃度の抗癌剤を腫瘍局所に集積でき、集積後は長時間にわたり緩やかに抗癌剤がマクロファージから排出されることで、腫瘍局所のみを長時間抗癌剤に曝露させることが可能である。

#### 【0038】

(2) 腹腔内マクロファージを運び屋とした、腹腔内節外性リンパ節へのがんワクチンデリバリーシステム

オリゴマンノース被覆リポソームの使用は、癌ワクチンにも応用できる技術である。癌ワクチンの効果は、いかに効率よく癌抗原を抗原提示細胞に抗原情報をインプットし、より効果的に癌細胞を攻撃させる免疫活性を誘導できるかという点が重要であると考えられている。この点において、オリゴマンノース被覆リポソームに癌抗原と免疫賦活剤を封入し、腹腔内に散布すると、これらの薬剤はマクロファージによって送達され、癌の転移巣となる領域リンパ節に到達し、局所での免疫活性を亢進させることができる。これまでの癌免疫療法で問題となっていた、免疫反応の活性化が不十分であったことによるワクチンの効果の弱さは、癌病巣局所での抗腫瘍免疫活性化によって改善することができる。

#### 【0039】

(3) 蛍光物質などを封入したオリゴマンノース被覆リポソームによる初期腹腔内転移局所の検出

R T - P C R法を用いた高感度の検出法によって腹腔内遊離癌細胞の存在が確かめられ、腹膜微小転移の可能性が高いと判断された場合でも生存率は50%程度である。このことは、腹膜微小転移局所の特定ができずにいることと無関係ではない。オリゴマンノース被覆リポソームを取り込んだマクロファージの集積場所と癌細胞の微小転移の生じる場所が同じであるという事実から、蛍光タンパク質などを術中でも認識容易な物質を封入したリポソームを術前24時間前に投与することにより腹膜微小転移局所を検出することが可能である。

#### 【0040】

(4) 他の応用

(A) 癌リンパ節転移に対する治療への応用

近年増加している乳癌では、リンパ節転移が患者予後に大きく影響する一方、広範なリンパ節廓清でも予後が改善されないことが理由となり、主たる治療法は縮小手術と化学療法の組み合わせに移行しつつある。乳癌では、腋下、鎖骨上窩、傍胸骨リンパ節を領域リンパ節としているので、これらからの再発が間々みられる。抗癌剤を入れたM3リポソーム、もしくは癌免疫療法として癌抗原と免疫賦活剤を入れたM3リポソームを、手術後病巣近傍へ注入することで、マクロファージにより領域リンパ節への効果的な薬剤送達が期待され、薬物療法のさらなる効果が期待される。この他にも同様の機序に基づいて、リンパ節好転移癌であるメラノーマ、甲状腺癌、肺癌の治療にも適応できる。

#### 【0041】

(B) 血液系腫瘍への適応

血液系腫瘍では、単核球、マクロファージ系の分化を示す腫瘍が治療適応対象となる。本発明のM3リポソームに入れた抗癌剤を分子標的性の高いものとすれば、腫瘍以外のマクロファージに取り込まれた場合でも、副作用を軽減することができ、腫瘍細胞に限った薬効を期待できる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

#### 【実施例】

##### 【0042】

実施例1：オリゴ糖被覆リポソームの製造方法および薬物、マーカー又はまたは、造影剤の封入方法

以下の方法により、マンノペンタオース(M5) (化1に示した化合物) 又はマンノトリオース(M3) ( $\text{Man} \alpha 1 \rightarrow 6$  ( $\text{Man} \alpha 1 \rightarrow 3$ )  $\text{Man}$  という構造を有するマンノトリオース ( $\text{Man} 3$ )) と、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPE)とを還元アミノ化反応で化学的に結合させM5-DPPEおよびM3-DPPEを合成した。

##### 【0043】

先ず、マンノペンタオース(M5)又はマンノトリオース(M3) 2.5mgに600 $\mu$ lの蒸留水を加えて攪拌溶解してオリゴ糖溶液を調製した。次に、クロロホルム/メタノール(1:1、体積比)混合液にDPPEを5mg/mlの濃度で溶解してDPPE溶液を調製した。また、メタノールに、 $\text{NaBH}_3\text{CN}$ を10mg/mlの濃度で溶解して $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 溶液を調製した。前記オリゴ糖の各溶液600 $\mu$ lに前記DPPE溶液9.4mlおよび前記 $\text{NaBH}_3\text{CN}$ 溶液1mlを加えて攪拌混合した。この反応混合液を60℃にて16時間インキュベートし、人工糖脂質を生成せしめた。合成した人工糖脂質はHPLCを用い高純度に精製した。

##### 【0044】

TRITCで標識されたタンパク質(実施例2)又はFITCあるいはローダミンで標識されたタンパク質(実施例3)を封入したリポソームは、以下のようにして作製した。

先ず、ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)、コレステロールおよび人工糖脂質(M5-DPPEまたはM3-DPPE)を1:1:0.1で混合したクロロホルム/メタノール溶液もしくはエタノール溶液をなし型フラスコにいれ、ロータリーエバポレーターで減圧乾固し脂質フィルムを作製した。次いで、TRITCで標識されたタンパク質(実施例2)又はFITCあるいはローダミンで標識されたタンパク質(実施例3)を含むPBS溶液(5mg/ml)0.3mlを脂質フィルムに加え、ボルテックスミキサーを用いて激しく攪拌し、M5-DPPE被覆リポソームまたはM3-DPPE被覆リポソームを作製した。TRITCで標識されたタンパク質又はFITCあるいはローダミンで標識されたタンパク質としては、FITC-BSAまたはTRITC-BSAを使用した。

##### 【0045】

その後、リポソームをPBSで数回洗浄し、リポソームに封入されていない可溶性の物質を遠心により取り除いた。さらにこのリポソームの粒径を1 $\mu$ mのフィルターを用いて整えた。封入タンパク質量はタンパク質量により、またリポソームの脂質組成比および薬物はHPLCによって定量した。

##### 【0046】

実施例2：マクロファージへの取り込みの評価方法と簡単な結果の説明

TRITCで標識されたBSAを封入したM5-DPPE被覆リポソームまたはM3-DPPE被覆リポソーム(コレステロールとして100マイクログラム)をマウス腹腔内に投与し、30分、60分、120分、180分後に腹腔内細胞を常法により回収した。回収した細胞をFITCで標識された抗CD11c抗体あるいはF4/80で染色し、その後FACSを用いて細胞に取り込まれたローダミンおよび細胞表面抗原(FITC)の蛍光強度を解析した。

##### 【0047】

図1はM3-DPPE被覆リポソームとM3-DPPEで被覆していないリポソームを投与し1時間後に細胞を回収し腹腔内細胞への取込みを観察したものである。M3-DPPE被覆リポソームを

投与した場合マクロファージのマーカーであるF4/80で染色される細胞の78%がTRITCの強い蛍光を持っていることから、マクロファージにTRITCで標識されたタンパク質を封入したM3-DPPE被覆リポソームが取り込まれたことが分かる。一方M3-DPPEで被覆していないリポソームを投与した場合はほとんど取込みが見られない。図1下段で示したようにM3-DPPE被覆リポソームはマクロファージに顆粒状に取り込まれている。

#### 【0048】

実施例3：マクロファージまたはリポゾームの標的部への集積の評価方法と簡単な説明

FITCあるいはローダミンで標識されたタンパク質を封入したM3-DPPE被覆リポゾーム100マイクログラム（コレステロール換算）を生理食塩水で希釈し、総量0.5ミリリットルをヌードマウス腹腔内に接種した。その後、経時的（3時間、6時間、12時間、24時間後）にマウスを屠殺し、観察した。マウスを開腹後、青色光（150Wハロゲン光源、LGPS-2に420-480のband pass filterを装着したもの）をマウス腹腔内の大網を含む上腹部に照射し、黄色のfilter（500nm以上の波長域の可視光を通すlong pass filter）を装着した実体顕微鏡（オリンパスGFP専用チェッカー、SZ40-GFP）下に暗視野で大網へのM3リポゾームの集積を緑色（FITC）としてデジタルカメラを介してパソコンに取り込み評価した。

ローダミンの場合、150Wハロゲン光源に、バンドパスフィルター545-580を用い、吸収フィルターとしてロングパスフィルター（590nm以上）を用いて観察した。

#### 【0049】

図2は大網へのM3-DPPE被覆リポゾームの集積を経時的にみたものである。3時間後にはすでに集積が認められ、12時間後に最大集積を示し、その後24時間まで集積が認められた。節外性リンパ節が低形成である $\gamma\delta$ T細胞欠失マウスではほとんど集積が認められないことから、M3-DPPE被覆リポゾームが節外性リンパ節に集積していることが分かる。一方M3-DPPEで被覆していないリポソームでは集積はほとんど見られなかった。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0050】

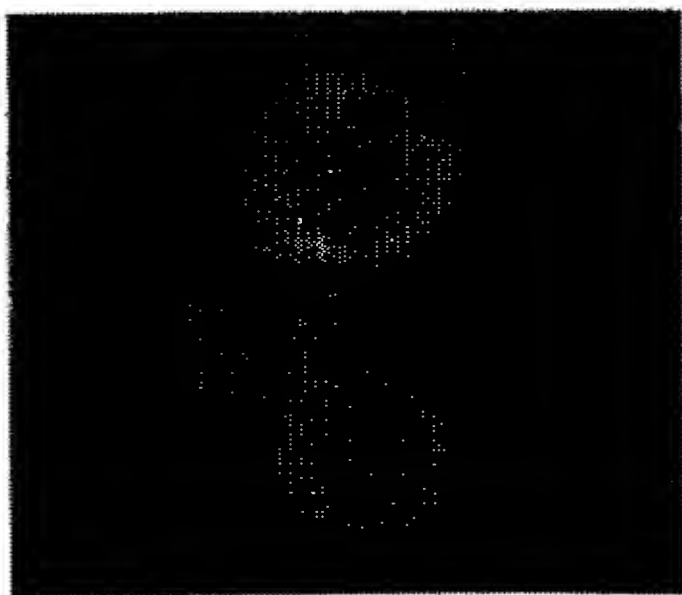
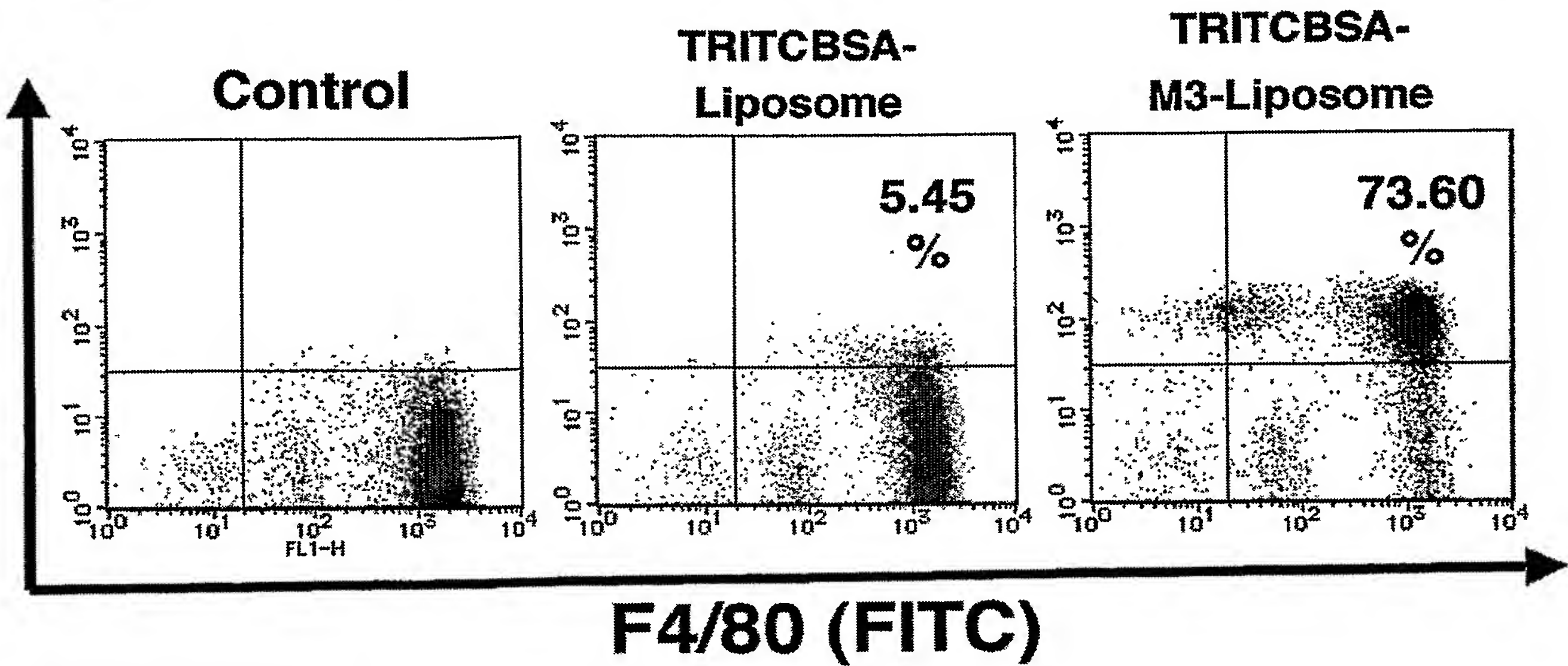
【図1】図1は、M3-DPPE被覆リポソームとM3-DPPEで被覆していないリポソームをマウスに投与して、1時間後に細胞を回収し腹腔内細胞への取込みを観察した結果を示す。

【図2】図2は、大網へのM3-DPPE被覆リポゾームの集積を経時的に観察した結果を示す。



【書類名】 図面  
【図 1】

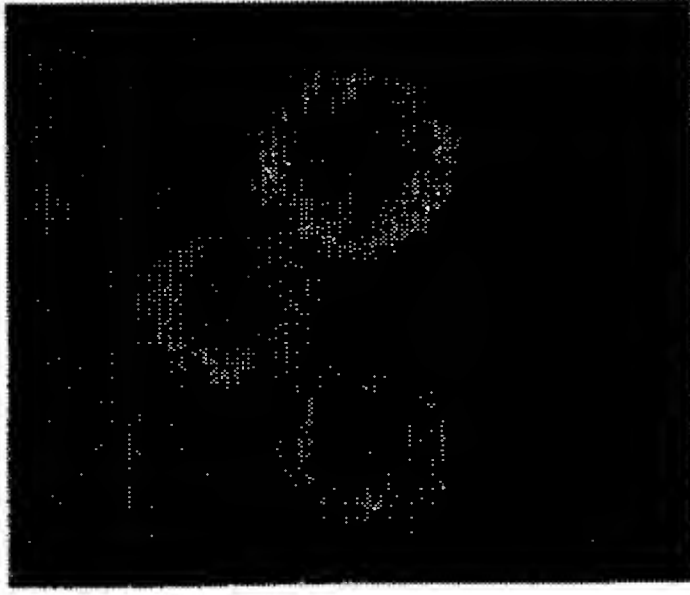
Uptake of Liposome by F4/80 Positive Cell



F4/80(FITC)



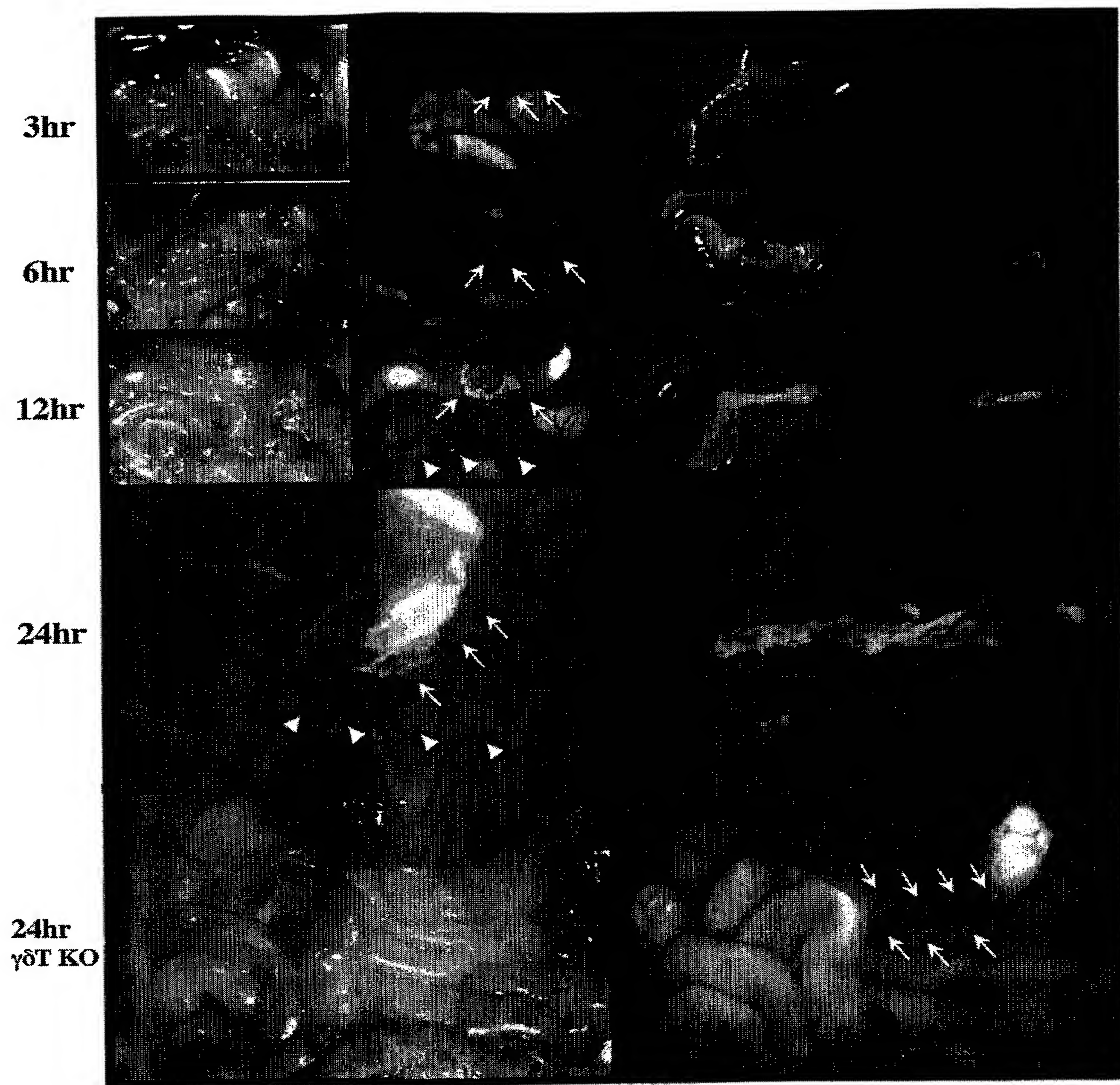
TRITC BSA-M3 liposome



Merge

【図 2】

**M3 liposome containing FITC-BSA accumulates omentum**



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 抗癌剤などの投与物質を標的部位に効率良く集積させることができるドラッグデリバリー組成物を提供すること。

【解決手段】 オリゴ糖被覆リポソームと投与物質とを含む、投与物質を標的部位に送達するためのドラッグデリバリーリポソーム組成物。

【選択図】 なし

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 7 6 8 0 4
受付番号	5 0 4 0 0 4 4 2 1 3 9
書類名	特許願
担当官	福田 政美 7 6 6 9
作成日	平成 1 6 年 5 月 1 0 日

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

## 【特許出願人】

【識別番号】	000125369
【住所又は居所】	東京都渋谷区富ヶ谷 2 丁目 2 8 番 4 号
【氏名又は名称】	学校法人東海大学

## 【特許出願人】

【識別番号】	000116622
【住所又は居所】	愛知県名古屋市中区三の丸三丁目 1 番 2 号
【氏名又は名称】	愛知県

## 【代理人】

【識別番号】	110000109
【住所又は居所】	東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階

【氏名又は名称】	特許業務法人特許事務所サイクス
----------	-----------------

## 【復代理人】

【識別番号】	110000109
【住所又は居所】	東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階

【氏名又は名称】	特許業務法人特許事務所サイクス
----------	-----------------

## 【指定代理人】

【識別番号】	504010040
【住所又は居所】	愛知県名古屋市千種区鹿子殿 1 番 1 号 愛知県が んセンター内

【氏名又は名称】	大野 龍三
----------	-------

特願 2 0 0 4 - 0 7 6 8 0 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 0 0 0 1 2 5 3 6 9 ]

1. 変更年月日 1 9 9 0 年 8 月 2 7 日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都渋谷区富ヶ谷 2 丁目 2 8 番 4 号  
氏 名 学校法人東海大学
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 1 1 月 1 7 日  
[変更理由] 住所変更  
住 所 東京都渋谷区富ヶ谷 2 丁目 2 8 番 4 号  
氏 名 学校法人東海大学

特願 2 0 0 4 - 0 7 6 8 0 4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 1 1 6 6 2 2 ]

1. 変更年月日

2 0 0 4 年 1 月 2 0 日

[変更理由]

住所変更

住 所

愛知県名古屋市中区三の丸三丁目 1 番 2 号

氏 名

愛知県